Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. T.H. Schiebler

---

# Lysosomale Enzyme in der Oogenese und Follikulogenese des Meerschweinchens

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Wolfgang Schmidtler

aus Rötz

Würzburg, den 6. November 1980

1981

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. T.H. Schiebler

---

# Lysosomale Enzyme in der Oogenese und Follikulogenese des Meerschweinchens

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Wolfgang Schmidtler

aus Rötz

Würzburg, den 6. November 1980

| | |
|---|---|
| Referent: | Prof. Dr. K.-H. Korfsmeier |
| Korreferent: | Prof. Dr. T.H. Schiebler |
| Dekan: | Prof. Dr. K.H. Wulf |

Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Inhaltsangabe


Einleitung 1

Material und Methoden 1

Semidünnschnitte 1
Enzymhistochemie 2

Ergebnisse 3

Semidünnschnitte 4
Eizelle 4
Follikelepithel 5

Histochemie 5
Primordialfollikel und 5
Primärfollikel 5
Sekundärfollikel 6
Tertiärfollikel 7
Follikelepithel 8
Degenerierende Follikel 8

Diskussion

Saure Phosphatase und ß-Glucuronidase 10
Unspezifische Esterase und Leistungen des Follikelepithels 13
Balbiani Körper 14
Degenerierende Follikel 15

Zusammenfassung 16

Literatur 17

Abbildungslegenden 22

Abbildungen 24

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0035

Einleitung:

Im Gegensatz zu Invertebraten (Pasteels 1973, Giorgi 1974, Schuel et al. 1975) und niederen Wirbeltieren (Korfsmeier 1978), sind in oligolecithalen Eizellen von Säugern nur beim Meerschweinchen (Adams et al.1966) und bei der Wüstenrennmaus (Korfsmeier 1980) nennenswerte Mengen lysosomaler Enzyme beschrieben worden. In der Meerschweinchenoocyte steht die saure Phosphatase offenbar mit einer Reservestoffbildung im Zusammenhang (Korfsmeier, 1979). Eine umfassende, histochemische Untersuchung saurer Hydrolasen während der Eizellentwicklung und der Follikulogenese fehlt bisher. Wir haben daher bei Meerschweinchen versucht, das früheste Auftreten von saurer Phosphatase, ß-Glucuronidase und unspezifischer Esterase in den Eizellen zu erfassen und das Verhalten der Enzyme während des Heranwachsens in Eizelle und Follikelepithel untersucht.

Material und Methoden:

Untersucht wurden die Ovarien von 75 Meerschweinchen (58 Tiere im Alter von 42 Embryonaltagen bis 25 Lebenstagen und 17 ausgewachsene, trächtige und nicht trächtige Weibchen). Die Tiere erhielten Altromin-MS® und Leitungswasser ad libidum, sowie als Zusatzfütterung Heu und gelegentlich Grünfutter, Halterung bei $22^{o} \pm 2^{o}C$ und 12-stündigem, künstlichen Hell- Dunkelwechsel; Tötung durch Dekapitation nach Äthernarkose jeweils abends gegen $18^{oo}$ Uhr. Die Altersbestimmung der embryonalen Tiere erfolgte nach der Methode von Kaufmann (1969), die eine Unsicherheit von $\pm$ 1 Tag einschließt.

Semidünnschnitte:

Fixation von Stücken mit 1-2 mm Kantenlänge für 1-2 Std.

in Glutaraldehyd (2,5 %ig in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,4), Spülen in Kakodylatpuffer 0,1 M; anschließend 2 Std. in $OsO_4$; Spülen in 0,1 M Kakodylatpuffer (pH 7,4); Entwässerung und Einbettung in Durcupan® (Fluka); Färbung mit Methylenblau-Azur II (Methylenblau 1% in 1% wässriger Boraxlösung: Azur II 1% in Aqua dest. = 1 : 1) an Jodsäure ($HJO_3$ 1% 5 Min.) vorbehandelten Semidünnschnitten (1-3 µm) über der Gasflamme (etwa 10 sek.).

Enzymhistochemie:

Fixierung frisch entnommener Ovarien in Formol-Calcium (4% pH 7) für 24 Std. bei 4°C; einmaliges Spülen in Holtschem Gemisch; Aufbewahren in Holtschem Gemisch für 24 Std.; Einfrieren der Ovarien in stickstoffgekühltem Propan; Herstellung von 10 µm dicken Kryostatschnitten bei -20° bis -30°C (System Duspiva-Dittes); Montage auf albuminisierte und erhitzte Objektträger.

Die Enzymnachweise erfolgten nach der Zusammenstellung in Lojda et al. (1976). Saure Phophatase (EC 3.1.3.2): Simultane Azokupplung nach Burstone (1958) modifiziert nach Barka und Anderson (1962) mit Naphtol-AS-TR-Phosphat als Substrat (0,3 mg/ml Pufferlösung, pH 5,0). Inkubationszeit: 60 min bei 37°C. ß-Glucuronidase (EC 3.2.1.31): Simultane Azokupplung modifiziert nach Hayashi et al. (1964) mit Naphtol-AS-BI-ß-D-glucuronid als Substrat (0,15 mg/ml Puffer pH 5,0). Inkubationszeit: 60 min bei 37°C. Unspezifische Esterase ( EC 3.1.1.6): Simultane Azokupplung modifiziert nach Davis und Ornstein (1959) mit 1-Naphtylacetat als Substrat (0,2 mg/ml Puffer pH 6,5). Inkubationszeit: 10 min bei Zimmertemperatur. Nachbehandlung bei allen drei Enzymen: Abgießen des Inkubationsmediums, Spülen in Aqua dest., Einstellen der Schnitte für mindestens 2 Std. in Formol-Calcium 4% bei Zimmertemperatur; 10 minütiges Spülen in fließendem Leitungswasser; Eintauchen in Aqua dest., Eindecken in Glyceringelatine.

Ergebnisse:

Die Einteilung der Follikelstadien im Säugerovar wird in der Literatur unterschiedlich gehandhabt. Wir verwenden bei unseren Untersuchungen die Einteilung nach Mossmann und Duke (1973) und Austin (1976). Die Größenangaben zu den Eizellen stammen aus unseren eigenen Messungen an Semidünnschnitten.

Definitionen:

Primordialfollikel:

Oocyte (Durchmesser 15 - 21 µm) mit einfachem, flachen Follikelepithel.

Primärfollikel:

Oocyte (Durchmesser 22 - 35 µm) mit einschichtigem, kubischen Follikelepithel.

Sekundärfollikel:

Oocyte (Durchmesser 36 - 48 µm) mit zwei oder mehr Schichten von isoprismatischen Follikelepithelzellen.

Tertiärfollikel:

Oocyte (Durchmesser über 48 µm) mit Antrum folliculi.

Semidünnschnitte

Eizelle:

Der Semidünnschnitt läßt im Cytoplasma der Eizelle deutlich voneinander zu unterscheidende Strukturen erkennen. Neben dunklen und hellen Granula treten fädige Gebilde auf.
Die schwach angefärbten Granula sind die häufigste Erscheinung, sie treten bereits im Primordial- und Primärfollikel auf. Im späten Primärfollikel und im Sekundärfollikel sind sie auf einer Seite der Eizelle angehäuft oder liegen kappenförmig dem exzentrisch gelegenen Zellkern auf. Während der weiteren Entwicklung zum Tertiärfollikel sind die hellen Granula wieder über das gesamte Cytoplasma der Eizelle verstreut.

Die dunklen Granula treten in geringerer Zahl auf und sind im Primordial- und Primärfollikel regellos über das Cytoplasma der Eizelle verteilt (Abb. 1). In den späteren Follikelstadien, besonders im Tertiärfollikel findet man dann die stark gefärbten Granula nahezu ausschließlich im peripheren Cytoplasma direkt unter dem Plasmalemm. (Abb. 2).

Die neben den granulären Strukturen vorkommenden fädigen Gebilde liegen im Primärfollikel und im frühen Sekundärfollikel in einem kompakten Haufen, der einen Durchmesser von bis zu 5 µm aufweist. Er liegt entweder in oder in direkter Nähe der exzentrischen Granulaansammlung dieser Oocytenstadien. Bei diesem Gebilde dürfte es sich um den Balbiani-Körper handeln.

Im Sekundärfollikel löst sich die Ansammlung in kleinere Einheiten auf, die sich im Wachstum der Follikelstadien zunehmend zum peripheren Cytoplasma hin orientieren. Hier finden wir auch noch im Tertiärfollikel gelegentlich ringförmige Strukturen.

Follikelepithel:

Im Semidünnschnitt weist das Follikelepithel in allen Follikelstadien in Anordnung und Struktur keine Besonderheiten gegenüber anderen Nagern auf: Beim Primordialfollikel finden wir flache Epithelzellen, später sind sie isoprismatisch. Mit zunehmendem Wachstum des Follikels wird der Follikelzellverband lockerer, und vom Sekundärfollikel an finden wir im Semidünnschnitt dunkle und helle Zellen. Beim späten Sekundärfollikel beginnend, bemerken wir in der Granulosa kreisrunde Höhlungen, die von einer geschlossenen Zellschicht umgeben sind. Die Form dieser Räume ist deutlich von Gewebsspalten mit lockerer Begrenzung zu unterscheiden, die zu Beginn der Antrumbildung auftreten.

In der Zona pellucida ist von Beginn ihrer Bildung an eine radiäre Streifung zu erkennen, die teils von der Eizelle, teils von der sie umgebenden Follikelepithelschicht ausgeht (Abb. 2).

Histochemie

Primordialfollikel und Primärfollikel:

Saure Phosphatase und ß-Glucuronidase lassen sich bereits im Primordialfollikel kurz nach ihrem Auftreten während der Ontogenese nachweisen. Zeitlich kurz hintereinander finden wir am 44. Embryonaltag die ß-Glucuronidase und kurz darauf am 50. Embryonaltag in Primordial- und Primärfollikel die saure Phosphatase. Zu dieser Zeit ist die Reaktion der ß-Glucuronidase jeweils intensiver als die der sauren Phosphatase. Bei beiden Enzymreaktionen erscheint das Reaktionsprodukt in den jungen Eizellen in 5-12 Granula pro mittleren Oocytenquerschnitt. Häufig liegen diese Granula exzentrisch gegenüber dem großen Zellkern angehäuft. Neben der granulären Reaktion kommt auch eine schwache diffuse saure Phosphatase und ß-Glucu-

ronidaseaktivität im Cytoplasma der Eizellen vor. Abgesehen vom zeitlich verspäteten Auftreten der sauren Phosphatase am 50. Embryonaltag finden wir in der Ontogenese vom 44. Embryonaltag bis zum erwachsenen Tier keinen Unterschied im Verhalten der Enzyme in den frühen Eizellen. Abb. 3 zeigt die Situation am 2. Lebenstag. Zahl, Anordnung und Farbintensität der reagierenden Granula verändern sich nicht mehr mit zunehmendem Alter der Meerschweinchen.

Die unspezifische Esterase läßt sich im Primordial- und Primärfollikel nicht nachweisen.

Sekundärfollikel:

Die ersten Sekundärfollikel treten um den 54. Embryonaltag auf. In den Oocyten dieses Follikelstadiums fallen die Nachweise der sauren Phophatase und der ß-Glucuronidase gleich aus. Die im Primärfollikel beschriebene Häufung der enzympositiven Granula am kernabgewandten Pol der Eizelle wird im Sekundärfollikel zunächst beibehalten (Abb. 4). Bis zum späten Sekundärfollikel nimmt die Zahl der Granula beträchtlich zu und eine Zählung wird wegen der gegenseitigen Überlagerungen in unseren Schnitten nicht mehr möglich. Gelegentlich finden wir im granulagefüllten Areal des Sekundärfollikels enzymfreie Aussparungen, die in ihrer Größe dem Balbiani-Körper entsprechen. Die Reaktion der ß-Glucuronidase ist in allen Präparaten prägnanter als die der sauren Phosphatase, da beim Nachweis der letzteren häufig auch das Cytoplasma schwach diffus mit gefärbt ist.

Die unspezifische Esterase ist erstmals im Sekundärfollikel als schwach diffuse Reaktion darstellbar. Sie tritt auch in der Ontogenese beim ersten Auftreten der Sekundärfollikel am 54. Embryonaltag auf. Innerhalb des gefärbten Cytoplasmas fallen kleine helle Aussparungen

ohne Reaktion auf. In Zahl und Größe entsprechen sie etwa den Granula, die beim Nachweis der sauren Phosphatase und ß-Glucuronidase Enzymaktivitäten aufweisen. Neben den Aussparungen treten auf der anderen Seite kleingranuläre Strukturen auf, die sich durch eine besonders kräftige Esteraseaktivität auszeichnen. Gelegentlich sind sie lokal gehäuft.

Tertiärfollikel:

In der Oocyte des Tertiärfollikels, der kurz vor der Geburt (um den 63. Embryonaltag) zum ersten Mal auftritt, finden wir im Cytoplasma wiederum eine kräftige Reaktion der sauren Phosphatase (Abb. 5) und der ß-Glucuronidase. Die Aktivität ist an Granula gebunden, die an Zahl während des Wachstums des Tertiärfollikels wiederum erheblich zunehmen. Eine Abgrenzung einzelner Granula ist in den meisten Fällen wegen gegenseitiger Überlagerungen nicht möglich. Aussparungen wie wir sie in den frühen Sekundärfollikeln in Größe eines Balbiani-Körpers gefunden haben, treten im Tertiärfollikel nicht mehr auf. Wiederum ist auch eine diffuse Reaktion im Cytoplasma zu erkennen; sie fällt bei der sauren Phosphatase deutlicher als bei der ß-Glucuronidase aus.

Die unspezifische Esterase reagiert in der Eizelle des Tertiärfollikels sehr kräftig, wobei der Oocytenkern und kleine runde Bezirke ausgespart bleiben. Neben dieser Anfärbung treten wiederum dunkle kleingranuläre Strukturen auf. Sie sind im peripheren Cytoplasma gehäuft (Abb. 6).

Ein Unterschied aller untersuchten Enzyme in Eizellen gleicher Reifegrade aber bei Tieren verschiedener Altersstufe ist weder im Sekundär- noch im Tertiärfollikel zu erkennen.

Follikelepithel:

Beim histochemischen Nachweis der untersuchten Enzyme treten in intakten Follikelepithelzellen von Primordial- bis Tertiärfollikeln weder die saure Phosphatase noch die ß-Glucuronidase in nennenswerter Aktivität auf. Nur ganz vereinzelt sind Granula mit positiver Reaktion im Cytoplasma einzelner Follikelepithelzellen zu erkennen. In Sekundärfollikeln und häufiger noch in Tertiärfollikeln treten außerdem einzelne degenerierende Granulosazellen bzw. Zellreste im Antrum folliculi auf, die eine kräftige saure Phosphatase- und ß-Glucuronidaseaktivität aufweisen.

Die unspezifische Esterase läßt sich zuerst in den Follikelepithelzellen des Sekundärfollikels in schwacher Ausprägung nachweisen. Mit zunehmendem Follikelwachstum nimmt diese diffuse Färbung zu. Im Tertiärfollikel ist die Aktivität nicht mehr gleichmäßig über das gesamte Follikelepithel verteilt. In der die Eizelle direkt umgebenden Follikelepithelschicht ist die Esteraseaktivität deutlich stärker. Sie setzt sich mit gleicher Aktivität in die radiäre Streifung der Zona Pellucida fort (Abb. 6). Der Inhalt der runden Höhlungen in der Granulosa von Sekundär- und Tertiärfollikeln wird durch die Reaktion der unspezifischen Esterase kräftig dargestellt (Abb. 7).

Auch das dem Lumen zugewandte Cytoplasma der Follikelepithelzellen weist eine verstärkte Esteraseaktivität auf.

Degenerierende Zellen besitzen neben saurer Phosphatase und ß-Glucuronidase auch eine unspezifische Esteraseaktivität.

Degenerierende Follikel:

In allen untersuchten Ovarien finden sich degenerierende Follikel. Von der Atresie sind alle Entwicklungsstadien betroffen, am häufigsten jedoch Sekundär- und Tertiärfollikel. Der Beginn der Degeneration ist histochemisch

und im Semidünnschnitt nicht an der Eizelle zu erkennen. Vielmehr finden wir in den ersten Degenerationsstadien spindelförmige Zellen, die im Semidünnschnitt dunkel hervortreten (Abb. 8) und die beim Nachweis der lysosomalen Enzyme im Cytoplasma ein granuläres Reaktionsprodukt aufweisen. Die ersten derartig geformten und hydrolasenpositiven Zellen finden sich in direkter Umgebung der Eizelle. Mit fortschreitender Degeneration nimmt die Zahl dieser Zellen und die Größe des Areals, das sie einnehmen, zu.

Beim Tertiärfollikel treten sehr früh in der Atresie im Antrum vermehrt abgelöste Epithelzellen und Zellbruchstücke auf. Bei fortschreitender Degeneration zerfallen ganze Areale des Follikelepithels deren Verband sich danach auflöst. Überall dort, wo wir morphologische Veränderungen am Epithel finden, treten auch die lysosomalen Enzyme deutlich auf (Abb. 9).

Bei den Eizellen ist der erste Hinweis auf eine Schädigung ihre Deformation und die Bildung eines Spaltes zwischen Oocyte und Follikelepithel. Mit Hilfe der Nachweisreaktion von saurer Phosphatase und ß-Glucuronidase ist es nicht möglich, intakte Eizellen von frühen Degenerationsstadien zu unterscheiden. Lediglich die unspezifische Esterase fällt schon zu Beginn der Atresie deutlicher als bei unversehrten Eizellen auf. Ihre Aktivität nimmt mit zunehmendem Verfall zu.

Diskussion:

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß bereits zu Beginn der Follikulogenese lysosomale Enzyme in der Meerschweincheneizelle auftreten. Schon vor der Geburt, wenn um den 44. Embryonaltag erstmals Primordialfollikel zu erkennen sind, ist die ß-Glucuronidase und mit geringer Verzögerung auch die saure Phosphatase nachzuweisen. Beide Enzyme treten in allen Follikelstadien während der Ontogenese der untersuchten Tiere in gleicher Ausprägung auf. Dasselbe gilt auch für die unspezifische Esterase, die erst in den größeren Follikeln kräftiger wird. Daraus schließen wir, daß das Vorkommen der untersuchten Hydrolasen in der Eizelle nur vom jeweiligen Reifegrad der Oocyte bzw. dem Follikelstadium abhängt, aber nicht vom Alter des Meerschweinchens.

Saure Phosphatase und ß-Glucuronidase:

Die zeitliche Differenz beim ersten Auftreten von saurer Phosphatase und ß-Glucuronidase in den jüngsten untersuchten Altersstufen und die intensive histochemische Reaktion der ß-Glucuronidase könnten auf eine heterogene Verteilung der beiden Enzyme hinweisen. Jedoch darf man nicht ausschließen, daß methodische Gründe zumindest für den Aktivitätsunterschied mitverantwortlich sind.

Zieht man in Betracht, daß sich Form und Verteilung der enzympositiven Granula in späteren Follikelstadien bei der sauren Phosphatase und der ß-Glucuronidase nahezu gleichen, liegt die Vermutung nahe, daß wenigstens ein Teil der Granula beide Enzyme enthält. In den Semidünnschnitten sind die hellen Granula so verteilt wie in den histochemischen Präparaten die saure Phosphatase- und ß-Glucuronidase-haltigen Gebilde. Nach beiden Darstellungsmethoden sind die Strukturen in jungen Follikelstadien einseitig im Ooplasma zu finden, während sie im älteren

Sekundärfollikel und im Tertiärfollikel über das gesamte Ooplasma verteilt sind. Daher nehmen wir an, daß die Hydrolasen-positiven Gebilde zu den hell erscheinenden Strukturen der Semidünnschnitte gehören.

Im Gegensatz dazu scheinen uns die dunklen Granula in den Semidünnschnitten aufgrund ihrer Anordnung nicht zu den Strukturen zu gehören, die hydrolytische Enzyme enthalten. In jungen Eizellen sind sie zwar regellos über das Cytoplasma verteilt, ihre randständige Lage in reifen Oocyten spricht aber dafür, daß es sich dabei um Rindenvakuolen handelt, die nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine saure Phosphatase enthalten (Anderson 1972, Korfsmeier 1979).

Es erhebt sich nun die Frage, an welche Organellen die beiden Hydrolasen gebunden sind; zur Beantwortung ist ein Vergleich mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen nötig. Adams und Hertig (1964) beschreiben in Primärfollikeln eine Ansammlung von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum, verschiedener Vesikel und einer geringen Zahl von Lysosomen um den hauptsächlich aus Golgi Cisternen bestehenden Balbiani-Körper. Dies entspricht unseren lichtmikroskopischen Darstellungen von hellen Granula zwischen denen ein diffus-fädiges Gebilde liegt. In älteren Follikeln verteilen sich die Organellen über das Ooplasma und es treten Besonderheiten an den Cisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulum auf. Adams und Hertig (1964) beschreiben Aufblähungen dieser Organelle und vermuten, daß das rauhe endoplasmatische Retikulum der Meerschweincheneizellen an der Herstellung und dem Transport von Reservematerial teilnehmen könnte. Die erweiterten ER-Vesikel, die gelegentlich vom endoplasmatischen Retikulum geformt werden, könnten dann separate Räume für eine Speicherung darstellen. Anderson (1972) findet eine saure Phosphatase-Reaktion in Vesikeln, die er als primäre Lysosomen interpretiert und in länglichen, membranösen

Strukturen, seiner Meinung nach sekundäre Lysosomen.

Wie der ultracytochemische Nachweis der sauren Phosphatase in Meerschweincheneizellen (Korfsmeier 1979) zeigt, kommt das Enzym nicht nur in den wenigen Lysosomen, sondern auch in den Cisternen des endoplasmatischen Retikulum vor, jedoch nicht in deren aufgeblähten Teilen. Das Auftreten von Hydrolasen in anderen Organellen als den Lysosomen ist nicht ungewöhnlich. So wird die ß-Glucuronidase nicht nur in Lysosomen, sondern auch im endoplasmatischen Retikulum gefunden (Fishman et al. 1967). Hiroyuki und Fishman (1969) stellten Enzymaktivitäten von ß-Glucuronidase und saurer Phosphatase bei Mäusegeweben sowohl in Lysosomen als auch in Mikrosomen fest. In unseren Untersuchungen treten beide hydrolytischen Enzyme lichtmikroskopisch in gleicher Verteilung in Erscheinung, deshalb dürften sie in denselben Organellen vorkommen.

Da die Enzymaktivität während der gesamten Oogenese wesentlich stärker auftritt als man für den physiologischen Abbau "verbrauchter" Organellen erwarten darf und weil elektronenmikroskopisch nur wenige Lysosomen zu finden sind (Adams und Hertig 1964), kann man davon ausgehen, daß saure Phosphatase (Adams und Hertig 1966) und ß-Glucuronidase neben dem Abbau andere Aufgaben in der Eizellentwicklung haben. Man könnte z.B. daran denken, daß die saure Phosphatase Reservematerial in eine speicherbare Form umwandelt (Korfsmeier 1979), wie es für die Ablagerung von Vitellogenin in niederen Vertebraten wahrscheinlich ist (Lit. s. Kunz und Schäfer 1978). Dabei könnte es sich um einen "begrenzten Abbau" eines höhermolekularen Stoffes in zwei oder mehr niedermolekulare Teile handeln, die als Reserve für den Verbrauch nach dem Follikelsprung zur Verfügung stehen (vgl. Korfsmeier 1978). Da die Aktivitäten von saurer Phosphatase und ß-Glucuronidase sich während der Oogenese annähernd gleich verhalten, dürften beide Enzyme, also auch die ß-Glucuroni-

dase, für die Entwicklung der Eizelle wichtige Aufgaben erfüllen, es fehlt jedoch ein umfassendes Konzept über die Rolle, die diese Enzyme im Wachstum der Meerschweincheneizelle spielen.

Unspezifische Esterase und Leistungen des Follikelepithels:

Eine genaue Vorstellung über die Aufgaben der unspezifischen Esterase in der wachsenden Eizelle haben wir nicht. Aus der Literatur ist uns nur eine weitere Spezies, die Katze, bekannt in deren Eizellen die unspezifische Esterase beschrieben wurde (Korfsmeier 1980).

Die mehr diffuse Verteilung des Reaktionsprodukts spricht für ein Vorkommen im ungeformten Cytoplasma, worin die hellen Aussparungen durch Organellen ohne dieses Enzym entstehen. Da beim Meerschweinchen die deutlichste Reaktion in dem Follikelstadium erscheint, in dem wir eine periphere Anordnung der Rindenvakuolen finden, könnte das Enzym mit diesen Gebilden im Zusammenhang stehen, die Szollosi (1962, 1967) als Sekret der Eizelle bezeichnet. Da Deane (1952) einen Zusammenhang der unspezifischen Esterase mit dem Lipidstoffwechsel vermutet, könnte man auch daran denken, daß eine Verbindung zwischen der unspezifischen Esterase und den in der späten Oogenese und der Follikelatresie auftretenden Lipiden besteht (Adams et al. 1966).

Unser Nachweis der unspezifischen Esterase in den Follikelepithelzellen der Sekundär- und Tertiärfollikel stimmt mit Untersuchungen anderer Autoren (Hunter und Kneiske 1957, Bulmer 1964) am Meerschweinchen und weiteren Spezies überein. Auffällig bei unseren Untersuchungen ist die besonders hohe Aktivität des Enzyms in den kleinen, rundlichen Höhlungen in Sekundär- und Tertiärfollikeln und besonders in der sie umgebenden Follikelepithellage. Das Phänomen dieser neben der Antrumbildung vorkommenden Höhlungen wurde erstmals beim Kaninchen 1875 von Call und

Exner beschrieben. Die auch bei anderen Spezies später gefundenen Bildungen werden nach den Erstbeschreibern auch Call-Exner-bodies (Lit. bei Harrison und Weir 1977) genannt.

Unsere Untersuchungen zeigen erstmals, daß histochemische Unterschiede zwischen dem Inhalt der Call-Exner-bodies und dem Liquor folliculi bestehen. Die besonders hohe Aktivität und die polare Anordnung des Enzyms in der zum Call-Exner-body gehörenden Granulosawand spricht für eine sekretorische Tätigkeit der Follikelzellen (Brambell 1956). Eine vergleichbar starke Aktivität finden wir in den Follikelepithelzellen, die später in Sekundär- und Tertiärfollikeln die Zona radiata bilden.

Balbiani-Körper:

In den Semidünnschnitten bemerken wir in den Oocyten vom Primärfollikel an bis zum frühen Sekundärfollikel den Corpus Balbiani (Balbiani 1864, 1893 bei verschiedenen Säugern und dem Menschen); beschrieben auch von Anderson und Beams (1960) und Adams und Hertig (1964) beim Meerschweinchen; von Hertig und Adams (1967), von Takeva (1967) beim Menschen und Meerschweinchen und von Hertig (1968) beim Menschen. Hinsichtlich seiner Funktion bestehen heute noch Unklarheiten; es wird diskutiert, ob die Ansammlung von Funktionsstrukturen als Ausgangspunkt für eine sinnvoll geordnete Verteilung von Organellen im Cytoplasma der Eizelle dient (Korfsmeier 1978). Dafür spricht auch die Beobachtung von Centrosomen im Bereich des Balbiani-Körpers (Anderson 1972) in der Oocyte des Meerschweinchens.

Wenn auch in unseren histochemischen Präparaten der Balbiani-Körper selbst ohne Enzymreaktionen ist, so hat er doch eine deutliche Beziehung zum Reaktionsprodukt von saurer Phosphatase und ß-Glucuronidase;denn die hydrolasepositiven Granula sind in seiner Nähe gehäuft,

und wenn er sich auflöst, verteilen sie sich gleichmäßig im Cytoplasma.

Degenerierende Follikel:

Frühere Autoren (Zerbian 1966, Zerbian und Goslar 1968) erwähnen bereits die Schwierigkeiten aufgrund von Hydrolasereaktionen in Eizellen des Meerschweinchens eine Degeneration von Follikeln festzustellen. Diesen Befund können wir für den Beginn der Atresie bestätigen, da auch in intakten Follikeln die Eizelle reichlich saure Phosphatase und ß-Glucuronidase enthält. Der Nachweis der unspezifischen Esterase in jungen Eizellen und die Verstärkung der Enzymreaktion in Oocyten großer Follikel läßt jedoch auch in unseren Präparaten eine sichere Abgrenzung degenerierender von intakten Eizellen zu.

Die auffälligsten Zeichen der Degeneration finden wir allerdings zuerst im Follikelepithel (siehe auch Stafford et al. 1942). Im Gegensatz zu Zerbian (1966) treten in den rein morphologisch veränderten Granulosazellen kräftige Reaktionen der drei von uns untersuchten Enzyme auf, wie es bei Zellen mit hoher autolytischer Aktivität zu erwarten ist. Mit dem Nachweis der unspezifischen Esterase in diesen Zellen stehen wir in Übereinstimmung mit Zerbian (1966) und mit Bulmer (1964).

Da der Beginn der Degeneration von Follikelepithelzellen in Eizellnähe liegt, dürften die betroffenen Zellen auch wirklich Granulosazellen sein; dies tritt besonders auch deutlich bei Tertiärfollikeln auf, in denen sich ganze Zellgruppen des Follikelepithels auflösen. Ob am Ende der Degeneration auch zusätzlich heterophagisch tätige Makrophagen einwandern und mit unseren Enzymnachweisen erfaßt werden, können wir nicht ausschließen.

Zusammenfassung:

Es wurden die Ovarien von 75 Meerschweinchen im Alter von 42 Embryonaltagen bis zum erwachsenen Tier an Semidünnschnitten und enzymhistochemisch auf das Vorkommen von saurer Phosphatase, ß-Glucuronidase und unspezifische Esterase lichtmikroskopisch untersucht.

Saure Phosphatase und ß-Glucuronidase können bereits im Primordialfollikel, unspezifische Esterase im Sekundärfollikel nachgewiesen werden. Alle drei Enzyme nehmen während des Oocytenwachstums an Aktivität zu, doch während Verteilung und Dichte der Hydrolasen sich im Zuge der Follikelreifung ändern, sind sie in denselben Follikelstadien in der Ontogenese der Tiere immer gleich.

Im Follikelepithel fällt die Reaktion der unspezifischen Esterase, besonders in den sog. Call-Exner-bodies auf. Während der Liquor folliculi keine nennenswerte Aktivitäten aufweist, ist der Inhalt der Call-Exner-bodies und das Cytoplasma der sie umgebenden Follikelepithelzellen durch das Reaktionsprodukt stark gefärbt.

Die Follikelatresie kann zumindest in fortgeschrittenen Stadien enzymhistochemisch und morphologisch erfaßt werden. Die Abgrenzung gegen intakte Follikel wird zuerst durch den Vergleich des Follikelepithels möglich.

Literatur:

ADAMS, E. C., HERTIG, A. T.: Studies on guinea pig oocytes. I. Electron microscopic observations on the development of cytoplasmic organelles in oocytes of primordial and primary follicles. J. Cell Biol. 21, 397-427 (1964).

ADAMS, E. C., HERTIG, A. T., FOSTER, S.: Studies on guinea pig oocytes. II. Histochemical observations on some phosphatases and lipid in developing and in atretic oocytes and follicles. Am. J. Anat. 119, 303-340 (1966).

ANDERSON, E.: The localization of acid phosphatase and the uptake of horseradish peroxidase in the oocyte and follicle cells of mammals. In: Oogenesis (Biggers, D., Schuetz, A.W. ed.) University Park Press, Butterworth, London, 87-117 (1972).

ANDERSON, E., BEAMS, H. W.: Cytological observations on the fine structure of the guinea pig ovary with special reference to the oogonium, primary oocyte and associated follicle cells. J. Ultrastructure Res. 3, 432-446 (1960).

ARVY, L.: Contribution a l'histoenzymologie des l'ovaire. Z. Zellforsch. 51, 406-420 (1964).

AUSTIN, C. R.: Cortical granules in hamster eggs. Exp. Cell. Res. 10, 533-540 (1956).

AUSTIN, C. R.: Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere. Schriftenreihe Pareys Studientexte 6. Parey Berlin-Hamburg (1976).

BALBIANI, E. G.: Sur la constitution du germe dans l'oef animal avant la fécondation. Comparaison de ce dernier avec l'ovule végétal. Compt. Rend. Acad. Sci (Paris) 58, 621-625 (1864).

BALBIANI, E. G.: Centrosome et "Dotterkern", J. Anat. Physiol. 29, (Paris 145-179 (1893).

BARKA, T., ANDERSON, P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using Hexazonium-p-Rosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem. 10, 741-753 (1962).

BRAMBELL, F. W. R.: Ovarian changes. In: Marshall's Physiology of Reproduction. (Parkes, A. S. ed. 3rd ed. Vol. 1) 397-542 (1956). Longmans Green, London and New York.

BULMER, D.: The histochemical distribution of ß-Glucuronidase activity in the ovary. J. Endocrinology 26, 171-172 (1963).

BULMER, D.: The histochemical distribution of certain ovarian enzymes, J. Anat. 98, (London) 27-36 (1964).

BURSTONE, M. S.: Histochemical demonstration of acid phosphatase with Naphtol-AS-Phosphatases. J. Nat. Cancer Inst. 21, 523-539 (1958).

CALL, E. L., EXNER, S.: Zur Kenntnis des Graafschen Follikels und des Corpus luteum beim Kaninchen. Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften Abt. III, 321-328 (Wien 1875).

DAVIS, B. J., ORNSTEIN, L.: High resolution enzyme localisation with a new diazo reagent, "hexazonium pararosaniline" J. Histochem. Cytochem. 7, 297-298 (1959).

DEANE, H. W.: Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the cycle. Am. J. Anat. 91, 363-414 (1952).

FISHMAN, W. H., GOLDMAN, S. S., DE LELLIS, R.: Dual localisation of ß-Glucuronidase on endoplasmic reticulum and in lysosomes. Nature 213, (London) 457-460 (1967).

GIORGI, F.: Acid phosphatase localisation in ovarian cells of Drosophila melanogaster: role of the Golgi apparatus. J. Histochem. 6, 71-78 (1974).

HARRISON, R. J., WEIR, B. J.: Structure of the mammalian ovary. In: The ovary 113-217, (Zuckerman, S., Weir, B. J. ed.) Vol. I, Academic Press, New York, San Francisco, London (1977).

HAYASHI, M.: Distribution of ß-Glucuronidase activity in rat tissues employing the Naphtol-AS-BI-Glucuronide hexazonium pararosanilin method. J. Histochem. Cytochem. 12, 659-669 (1964).

HERTIG, A. T.: The primary oocyte. Some observations on the fine structure of Balbiani's vitelline body and the origin of the annulate lamellae. Am. J. Anat. 122, 107-138 (1968).

HERTIG, A. T., ADAMS, E. C.: Studies on the human oocytes and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. J. Cell Biol. 34, 647-675 (1967).

HIROYUKI, I., FISHMAN, W. H.: Dual localization of ß-Glucuronidase and acid phosphatase in lysosomes and in microsomes. II. Membrane-associated enzymes. Histochemie 20, 300-321 (1969).

HUNTER, R. L., KNEISKE, K. M.: Quantitative study of non-specific esterase in the rat ovary. J. Histochem. Cytochem. 5, 154-158 (1957).

IOANNOU, J. M.: Oogenesis in the guinea pig. J. Embryol. Exp. Morphol. 12, 673-691 (1964).

KAUFMANN, P.: Die Meerschweinchenplacenta und ihre Entwicklung. Z. Anat. Entwicklungs-Geschichte 129, 83-101 (1969).

KÖNIG, P. A.: Histotopochemie von Enzymen im menschlichen Ovarium. Fortschr. Geburtshilfe Gynaekol. 23, 77-203 (1965a).

KÖNIG, P. A.: Über die Lokalisation von Enzymen in den endokrinen Formationen des menschlichen Ovarium. Gynaecologia 159, 107-124 (1965b).

KORFSMEIER, K. H.: Cytoplasma und Reservestoffe der wachsenden Eizelle, Verh. Anat. Ges. 72, 827-838 (1978).

KORFSMEIER, K. H.: Zur Bedeutung lysosomaler Enzyme während der Oogenese. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chemie 360, 308-309 (1979).

KORFSMEIER, K. H.: Acid phosphatase in the guinea pig oocytes. Histochemistry 63, 123-127 (1979).

KORFSMEIER, K. H.: Lysosomal enzymes in oocytes of the Mongolian gerbil, Meriones unguiculatus. (In Vorbereitung).

KUNZ, W., SCHÄFER, U.: Oogenese und Spermatogenese. (Bausteine der modernen Physiologie 4) G. Fischer 1978, Stuttgart, New York.

LOJDA, Z., GOSSRAU, R., SCHIEBLER, T. H.: Enzymhistochemische Methoden, Springer Verlag (1976), Berlin, Heidelberg, New York.

MOSSMANN, H. W., DUKE, K. L.: Comparative morphology of the mammalian ovary. The University of Wisconsin Press (1973).

PASTEELS, J. J.: Yolk and lysosomes. In: Lysosomes in biology and pathology (Dingle, J. T., ed.) Vol. III, 216-234, North Holland Publishing Company: Amsterdam, Oxford (1973).

SCHUEL, H., WILSON, J. R., BRESSLER, R. S.: Heterogeneous distribution of "lysosomal" hydrolases in yolk platelets isolated from unfertilized sea urchin eggs by zonal centrifugation. Development. Biol. 46, 404-412 (1975).

STAFFORD, W. T., COLLINS, C. F., MOSSMAN, H. W.: The thecal gland in the guinea pig ovary, Anat. Rec. 83, 193-207 (1942).

SZOLLOSI, D.: Cortical granules: A general feature of mammalian eggs? Fertil. 4, 223-224 (1962).

SZOLLOSI, D.: Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. Anat. Rec. 159, 431-446 (1967).

TAKEVA, Z.: On the formation of corpus Balbiani in the ovogonia of man and guinea pig. Experientia 32, 509-511 (1976).

ZERBIAN, K.: Über das histochemische Verhalten einiger Enzyme bei der Follikelatresie im Ovarium des Meerschweinchens. Acta Histochem. 23, 303-321 (1966).

ZERBIAN, K., GOSLAR, H. G.: Das histochemische Verhalten der Azolesterase sowie weiterer Oxydoreduktasen bei der Follikelatresie im Ovarium einiger Nager. Histochemie 13, 45-56 (1968).

ZUCKERMAN, S., BAKER, T. G.: The development of the ovary and the Process of oogenesis. In: The ovary (Zuckerman S., Weir, B. ed.). Second edition, Vol. I Academic Press 41-67, New York, San Francisco, London (1977).

Abbildungslegenden:

Abb. 1: Primordial- und Primärfollikel im Ovar eines 15 Tage alten Meerschweinchens; Semidünnschnitt. Im Cytoplasma sind helle und dunkle Granula zu erkennen. BK = Balbiani-Körper
Vergr. 560 x

Abb. 2: Tertiärfollikel im Ovar eines ausgewachsenen Meerschweinchens; Semidünnschnitt. Im Cytoplasma der Eizelle liegen die hellen Granula über das gesamte Cytoplasma verteilt, während die dunklen Granula überwiegend peripher auftreten.
Vergr. 560 x

Abb. 3: Nachweis der ß-Glucuronidase im Ovar eines 2 Tage alten Meerschweinchens. In den Primordial- und Primärfollikeln ist das granuläre Reaktionsprodukt im Cytoplasma der Eizellen gelegentlich exzentrisch angehäuft.
Vergr. 560 x

Abb. 4: Nachweis der ß-Glucuronidase im Ovar eines ausgewachsenen Meerschweinchens. Die ß-Glucuronidase-positiven Granula sind im Cytoplasma der Eizelle am Kern-abgewandten Pol angehäuft. Im Follikelepithel ist ein Call-Exner-Body (CEB) zu erkennen.
Vergr. 560 x

Abb. 5: Nachweis der sauren Phosphatase in einem frühen Tertiärfollikel aus dem Ovar eines 7 Tage alten Meerschweinchens. Im Ooplasma tritt bereits zu Beginn der Antrumbildung eine sehr kräftige granuläre Reaktion auf.
Vergr. 560 x

Abb. 6: Nachweis der unspezifischen Esterase in einem Tertiärfollikel eines 21 Tage alten Meerschweinchens. Im Ooplasma fällt eine kräftige diffuse Reaktion auf, in der kleine runde Bezirke ausgespart sind. Ein deutlicher Nachweis des Enzyms gelingt außerdem in der radiären Streifung der Zona pellucida und in den Oocyten-nahen Follikelepithelzellen.
Vergr. 560 x

Abb. 7: Nachweis der unspezifischen Esterase im Ovar eines ausgewachsenen Meerschweinchens. In dem Sekundärfollikel tritt die Reaktion im Lumen der Call-Exner-Bodies (CEB) am kräftigsten auf.
Vergr. 560 x

Abb. 8: Degenerierender Sekundärfollikel im Ovar eines ausgewachsenen Meerschweinchens; Semidünnschnitt. Während die Eizelle keine morphologische Veränderungen erkennen läßt, sind in der Granulosa einzelne Zellen deformiert.
Vergr. 560 x

Abb. 9: Nachweis der ß-Glucuronidase in einem degenerierendem Follikel aus dem Ovar eines erwachsenen Meerschweinchens. Zentral gelegene Granulosazellen zeigen eine kräftige Reaktion. Die Eizelle ist von einem Schrumpfungsspalt umgeben.
Vergr. 560 x

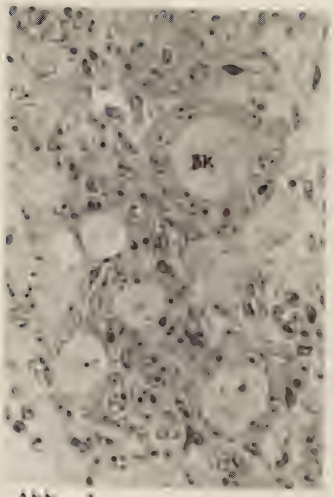


Abb. 1

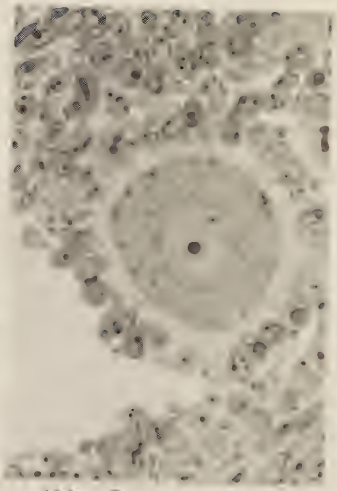

Abb. 2

Abb. 3

Abb. 4

Abb. 5

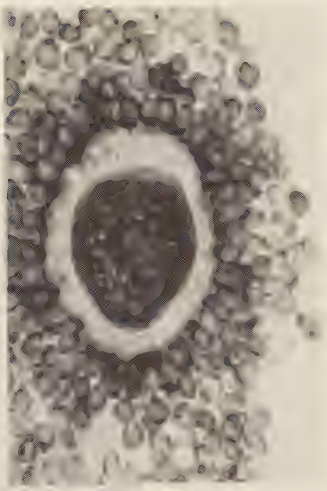

Abb. 6

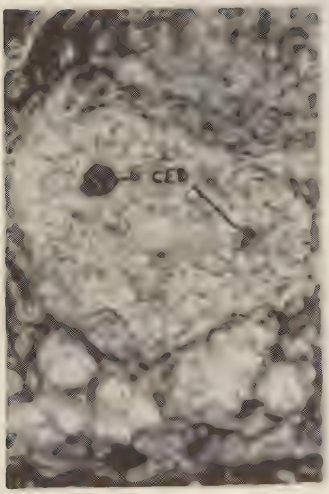


Abb. 7

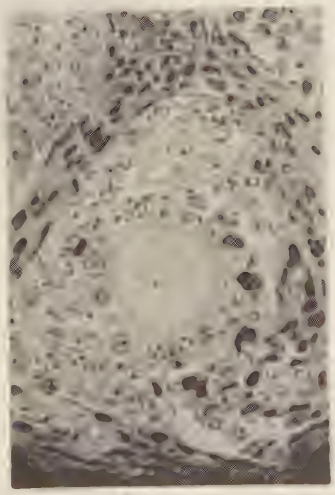

Abb. 8

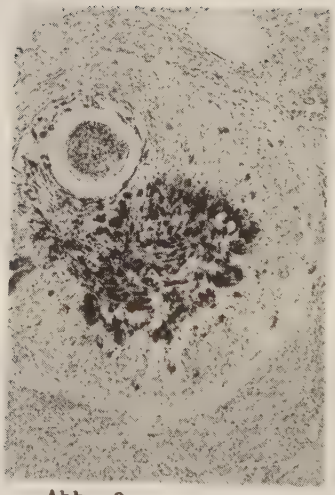

Abb. 9

Danksagung

Aufrichtigen und herzlichen Dank möchte ich richten an meinen Doktorvater Prof. Dr. K.-H. Korfsmeier für seine hilfreichen Hinweise und Bemühungen zur Vollendung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 2. Nov. 1951 wurde ich, Wolfgang, Johann Schmidtler in Rötz geboren. Im Jahre 1958 trat ich in die Grundschule Rötz ein, von der ich nach vier Jahren in das Gymnasium Cham überwechselte. Die Reifeprüfung legte ich im Jahre 1973 am Robert-Schuman-Gymnasium in Cham ab. Anschließend leistete ich den Grundwehrdienst und bekam nach dessen Beendigung einen Studienplatz für Zahnmedizin an der Universität Würzburg zum Wintersemester 1974/75.

Seit dem 12. August 1977 bin ich mit meiner Frau Marie-Luise, geb. Hofstetter, verheiratet, mit der ich eine zweijährige Tochter habe. Nach bestandenem zahnmedizinischem Staatsexamen im Januar 1980 wurde ich als Assistenzzahnarzt in einer Praxis in der Nähe meines Heimatortes angestellt, wo ich derzeit tätig bin.

Wolfgang Schmidtler

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80